

〔研究ノート〕

大豆複合脂質に関する基礎的研究

田尾早奈英・田中伸子

Research on Conjugated Lipids in Soybean

Sanae TAO and Nobuko TANAKA

Lipids have three important functions; high energy nutrient, structure material of biomembrane, and signal molecule. These functions are related significantly to the conjugated lipid that is one of the lipid groups composed of glycolipids and phospholipids.

In this study, we examined the characteristic distribution pattern of the conjugated lipid which accounts for 15% of the weight of total lipids from soybean.

The results obtained are as follows:

1. The content of gangliosides in soybean was $49.2 \mu\text{g/g}$ dry tissues and its level was very low.

The solubility of the extracted gangliosides indicated that the hydrophobic property reacted more strongly than the hydrophilic property.

2. There were many ingredients in the fraction of neutral glycolipids, and ceramide monohexoside (CMH) was the main ingredient (33.0% of the total weight). This CMH was a mixture of cerasin type (83.6%; the higher RF value of CMH on TLC) consisting of straight chain fatty acids and phrenosin type (16.4%) consisting of hydroxyl fatty acids.
3. The main ingredients of phospholipids in soybean were phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine.

Contrary to some preceding reports, the concentration level of phosphatidylinositol in soybean was apparently low.

Key words: physiological functional component (機能性成分素材), glycolipid (糖脂質), phospholipid (リン脂質), ganglioside (ガングリオシド), soybean (大豆)

1. 緒 言

脂質は効率のよいエネルギー源であり、加えて生体膜の構成成分、生理活性脂質（シグナル分子）としての生理機能が注目を浴び、近年、脂質研究の重要性がますます高まっている¹⁾。

これらの生理機能は、脂質の中でも複合脂質といわれるグループ（糖脂質やリン脂質）が深い関わりを持っている。例えば糖脂質、中でもシアル酸が結合

したガングリオシドは、神経分化・神経機能の調節²⁾、抗ガン性との関連から³⁾多岐にわたる研究が行われてきた重要な生理活性物質である。一方、リン脂質も生体膜の主要な構成成分であり、免疫疾患、アレルギー疾患などの生体防御反応を発症するエイコサノイドの基質材料となり¹⁾、その有効性が期待されている。

健康志向が高まる現在、機能性食品素材として食品微量成分の生理機能に基づく医薬開発、機能性食

品の開発などが活発に行われている。昔から高タンパク、高脂肪の栄養価の高い食品として我々になじみが深い大豆は、タンパク質の血中コレステロール値の低下作用⁴⁾やイソフラボンの肥満抑制作用⁵⁾、オリゴ糖のビフィズス菌増殖に関する整腸作用⁶⁾など、含有される機能性成分について多方面から研究が進められている。

そこで本研究では、機能性食品素材として大豆子実に着目し、総脂質の約15%を占める複合脂質の基礎的研究の一步として、まずその分布特徴について検討を加えた。

2. 実験方法

2-1. 試料および総脂質の抽出・分離方法

乾燥した大豆子実（北海道産，5.00 g）をウィレー氏ミルで粉碎し，試料に用いた。

総脂質の抽出は，一般的な脂質抽出法である Bligh-Dyer 法⁷⁾をもとに，両親媒性の複合脂質に対応させるため一部変更した。すなわち試料10倍量のクロロホルム-メタノール（C-M=2:1）を加え室温にて第1回抽出を行い，抽出液を濾過後，その試料残渣に5倍量のC-M-W=1:2:0.8を加えて第2回抽出を行った。この2回分の濾液を合わせた後，C-M-Wの系を2:2:1.8となるように調整し，溶媒分画にて2層に分離した。

2層とも引き続き，Iatrobeads（IB，6 RS-8060，Iatron社；東京，日本）を用いた吸着カラムクロマトにより，脂質クラスの分離を行った。すなわちUpper層とLower層をそれぞれ10倍量のクロロホルム（中性脂質画分），40倍量のアセトン（大部分の糖脂質と少量のリン脂質画分），10倍量のメタノール（大部分のリン脂質と微量の糖脂質画分）を連続的に流下させ，得られたフラクションを順にFr.1～Fr.6とした。Fr.5とFr.6は，DEAE-Sephadex A-25（アセテート型，Pharmacia社；ウプサラ，スウェーデン）による陰イオン交換カラムクロマトを行い，中性糖脂質と酸性糖脂質の分離を試みた。中性糖脂質はC-M-W=3:7:1で，酸性糖脂質はC-M-0.2 mol $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ =3:7:1とC-M-2.0 mol $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ =3:7:1の溶媒系でそれぞれ溶出した。

2-2. 薄層クロマトグラフィー分析（TLC）

TLCによる検討には，高分解能薄層クロマトグラフィー（HPTLC，Silica gel 60，MERCK社；ダームシュタット，ドイツ）を用いた。

糖脂質は，溶媒C-M-0.2% CaCl_2 =65:25:4で展開し，オルシノール硫酸⁸⁾を噴霧後，100℃で15分間加熱し検出した。

リン脂質は1D-TLCならびに2D-TLCを行った。一次展開溶媒はC-M-28% NH_4OH - H_2O =65:35:8を，二次展開溶媒は CHCl_3 - CH_3COCH_3 - CH_3OH - CH_3COOH - H_2O =5:2:1:1:0.5⁹⁾をそれぞれ用い，ディットマー試薬¹⁰⁾を噴霧し検出した。脂質の同定は，標準物質および文献の R_f 値との比較，および各種の呈色反応を適宜に組み合わせて行った。

2-3. 中性糖脂質の相対比測定

中性糖脂質画分の1D-TLCプレートはデンストメーター（島津二波長フライングスポットスキャニングメーターCS-9300 PC，波長540 nm）で，呈色度の相対比を求めた。

2-4. ガングリオシドの定量

ガングリオシドは，結合しているシアル酸をレゾルシノール塩酸法により，測定波長580 nmで比色定量¹¹⁾した（島津ダブルビーム分光光度計UV-180使用）。シアル酸の標準物質としてN-アセチルノイラミン酸（NeuAc）を用いた。

3. 結果および考察

本実験では，大豆子実に含まれる複合脂質全般を抽出するため，抽出効率がよく，夾雑物の混入が少ないBligh-Dyer法に準じた方法で総脂質を抽出した（図1）。

溶媒分画後に行ったIBカラムによる脂質クラス別の各画分（Fr.1～Fr.6）の1D-TLCを図2に示す。Aはオルシノール硫酸発色で主に糖脂質を，Bはディットマー試薬による発色でリン脂質を比較検討した。Fr.4にトリグリセリドが，Fr.2，3，5，6に糖脂質の分布が見られた。さらに，リン脂質はFr.6にのみ確認された。糖脂質の分布が見られた

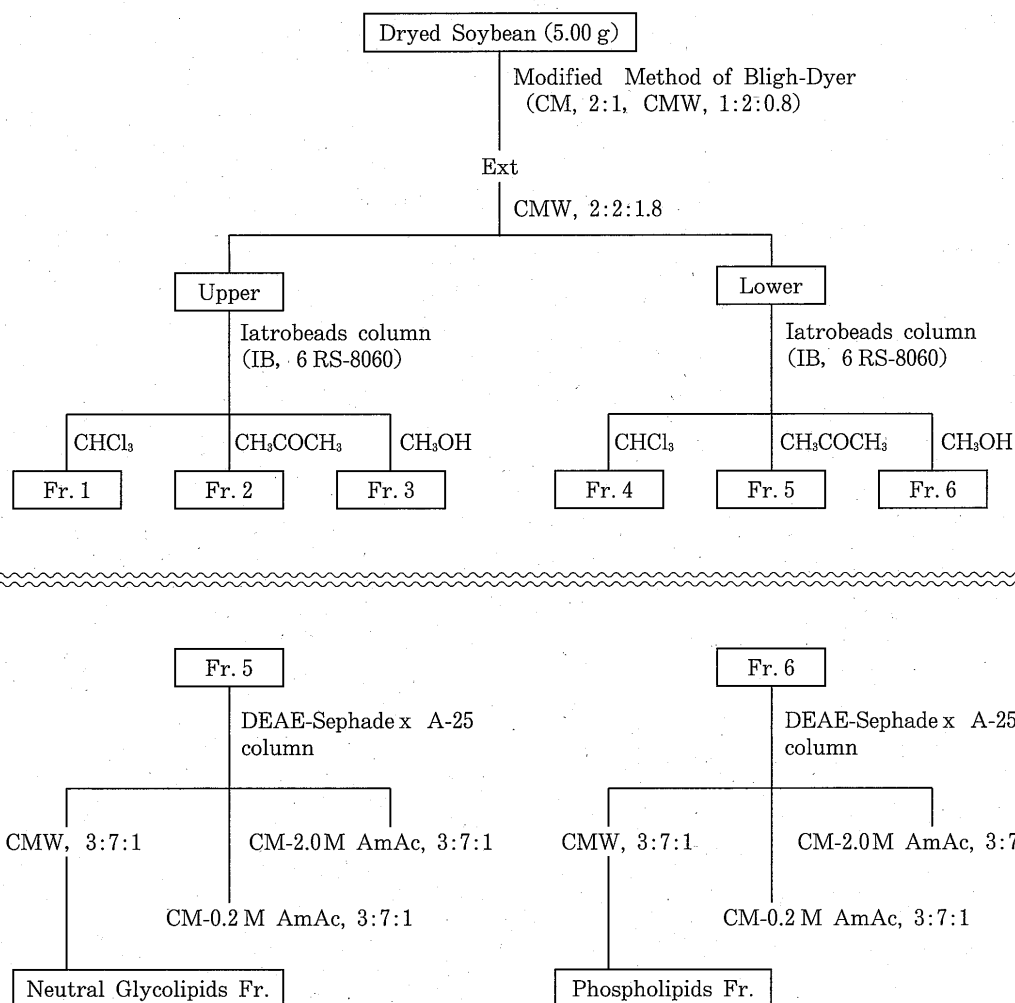


Fig.1 Isolation procedure for conjugated lipids from soybean

Fr. 2, 3, 5, 6 は、レゾルシノール塩酸法で酸性糖脂質ガングリオシドの定量を行った（表1）。その結果、総ガングリオシド量は $49.2\mu\text{g NeuAc/g dry tissue}$ と非常に低い数値を示した。今回の抽出法によるガングリオシドの分布は Lower 層（Fr. 5, 6）に偏っており、両親媒性のうち疎水性の比較的強いガングリオシドの存在が推定された。

さらに、糖脂質が混在していた Fr. 5 と Fr. 6 をそれぞれ陰イオン交換カラム（DEAE-Sephadex A-25）にかけ、中性糖脂質から酸性糖脂質の分離を試みた。中性糖脂質の構成を明らかにするために標準物質と同一プレート上で比較検討し、分布パターンは便宜上、Rf 値の低いほうから順に番号を付け、デンストメーターにより相対比を求めた（図3、表2）。中性糖脂質の主成分はセラミドモノヘキシンド

（CMH）で 33.0% を占めていた。CMH はヒドロキシ脂肪酸からなるフレノシン型（16.4%）と、直鎖脂肪酸からなるケラシン型（83.6%）の混合体であった。植物に多く分布するモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）や、ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）などのグリセロ糖脂質と推定される成分（No. ④、⑥）も検出されたため、今後さらに詳細な検討を加えてゆきたい。

リン脂質 Fr. 6 は 2 D-TLC を行ったところ（図4）、主成分としてホスファチジルエタノールアミン（PE）とホスファチジルコリン（PC）の分布が認められた。さらに PC の下部に微量のレゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）が確認された。LPE の下部の未確認成分は、その Rf 値から大豆の主要なリン脂質¹²⁾の一つとされるホスファチジルイノ

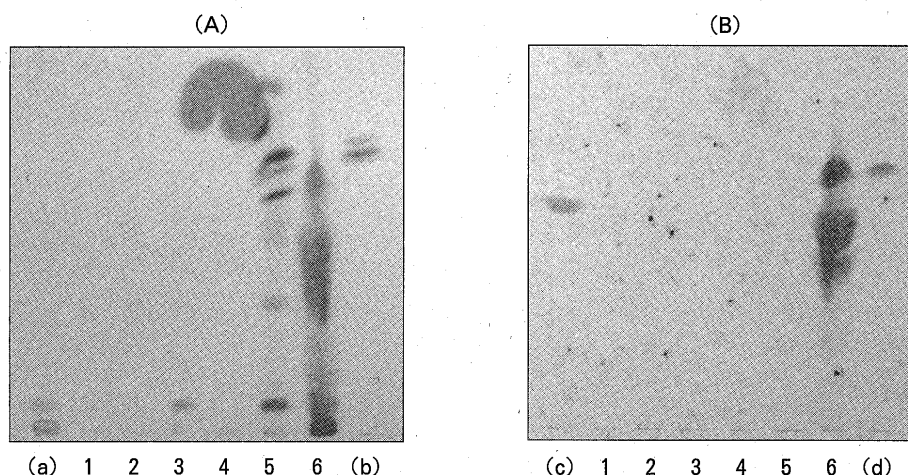


Fig. 2 1D-TLC of total lipids from soybean

Lane (a): standard GM 4, GM 1, GD 1 a, GD 1 b, GT 1 b; Lane (b): standard Ceramide monohexoside (CMH); Lane (c): standard Phosphatidylcholine (PC); Lane (d): Phosphatidylethanolamine (PE); Lane 1: Fr. 1; Lane 2: Fr. 2; Lane 3: Fr. 3; Lane 4: Fr. 4; Lane 5: Fr. 5; Lane 6: Fr. 6
The plate(A) was developed with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-0.2\%CaCl}_2$ (65:25:4), visualized with orcinol- H_2SO_4 reagent. The plate(B) was developed with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-28\%NH}_4\text{OH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (65:35:8), visualized with Dittmer-Lester reagent.

Table 1 Ganglioside concentration

Fraction No.	Ganglioside concentration ($\mu\text{g NeuAc/g dry tissue}$)
Fr. 2	2.0
Fr. 3	1.6
Fr. 5	25.9
Fr. 6	19.7
total	49.2

シトール (PI) か、あるいはレゾホスファチジルコリン (LPC) である可能性が示唆された。PI はホルモンや化学物質が細胞内にその情報を伝達する際、セカンドメッセンジャーの役目を果たす¹³⁾といわれている。文献では主成分の一つであったが、TLCの結果では微量成分として認められており、抽出法に由来するのか、またはそれ以外の原因によるものなのか、今後明らかにしてゆきたい。

4. 要 約

脂質は3つの基本的機能（エネルギー源、膜構成成分、シグナル分子）を持ち、脂質研究の重要性は益々高まっている。その基本的な機能は、脂質の中でも

特に複合脂質といわれているグループが深い関わりを持っている。複合脂質は大きくリン脂質と糖脂質に分類され、高機能性成分として多方面から検討が加えられ、現在に至っている。本研究では総脂質の約15%を複合脂質が占めるといわれている大豆子実を機能性成分素材として位置付け、その分布の特徴について検討し、以下の結果を得た。

1. ガングリオシド量は $49.2\mu\text{g NeuAc/g dry tissue}$ と低い数値を示した。溶媒分画の結果から比較的疎水性の強いガングリオシドの存在が推定された。
2. 中性糖脂質の主成分はセラミドモノヘキソシドで、全体の33.0%を占めていた。このCMH

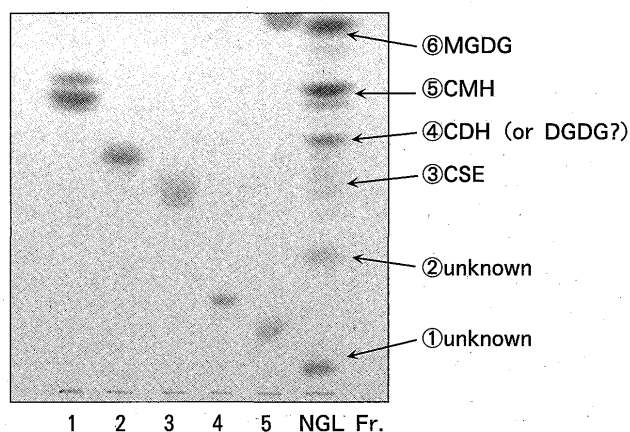


Fig. 3 1D-TLC of neutral glycolipids fraction from soybean

Standard Lane 1: Ceramide monohexoside (CMH)
 Lane 2: Ceramide dihexoside (CDH)
 Lane 3: Sulfatide (CSE)
 Lane 4: Globoside
 Lane 5: GM 4

The plate was developed with $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-0.2\%CaCl}_2$ (65:25:4), visualized with orcinol- H_2SO_4 reagent.

Table 2 The percentage of neutral glycolipids

Band No.	Ingredient	Percentage (%)	
1	unknown	13.2	
2	unknown	6.1	
3	CSE	0.9	
4	CDH (or DGDG?)	15.3	
5	CMH (cerasin type)	83.6	33.0
	CMH (phrenosin type)	16.4	
6	MGDG	31.5	
total		100.0	

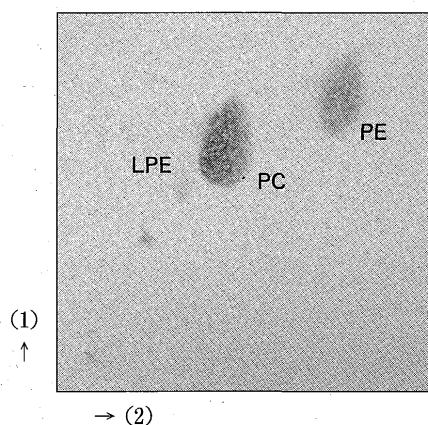


Fig. 4 2D-TLC of phospholipids fraction from soybean

The plate was developed with the following solvent systems;
 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-28\%NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}$ (65:35:8) in the first run (1) and
 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{COCH}_3\text{-CH}_3\text{OH-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (5:2:2:1:0.5) in the second Run(2).
 The components were visualized with Dittmer-Lester reagent.

は構成脂肪酸の違いにより、フレノシン型とケラシン型の2成分の混合体であった。

3. リン脂質の主成分はホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルコリンの2成分で、文献では高濃度に含まれていたホスファチジルイノシトールは低い結果であった。

参考文献

- 1) 清水孝雄, 新井洋由: ダイナミックに新展開する脂質研究, 羊土社, 18-23 (2005)
- 2) 奥山治美, 安藤進: 脳の働きと脂質, 日本脂質栄養学会, 27-49 (1997)
- 3) 安藤進: 脳機能とガングリオシド, 共立出版, 96-100 (1997)
- 4) Fukushima, D: *Food Sci. Technol. Res.*, **7**, 8-16 (2001)
- 5) 小松龍史: 月刊フードケミカル, **12**, 27-33 (1993)
- 6) 山内文男, 大久保一良: 大豆の科学, 朝倉書店, 71-72 (1992)
- 7) E. G. Bligh, W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959)
- 8) L. Svennerholm: *J. Neurochem.*, **1**, 42-43 (1956)
- 9) 日本生化学会編: 新生化学実験講座4 脂質II リン脂質, 東京化学同人, 31-47 (1991)
- 10) J. C. Dittmer, R. L. Lester: *J. Lipid Res.*, **5**, 126 (1964)
- 11) L. Svennerholm: *Biochem. Biophys. Acta.*, **24**, 604-611 (1957)
- 12) 矢沢一良, 増沢康男: 油化学, **40**, 845-857 (1991)
- 13) 加藤博之, 竹縄忠臣: 油化学, **37**, 60-73 (1988)

(たお さなえ 食物科学科)

(たなか のぶこ 食物科学科)